



## Metodologia para Seleção de População Resistente de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a Milhos Transgênicos *Bt* em Laboratório Visando Estudo de Condições que Favorecem o Manejo da Resistência no Campo

Natália Alves Leite<sup>1</sup>  
Simone Martins Mendes<sup>2</sup>  
Eliseu José Guedes Pereira<sup>3</sup>

### Introdução

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga endêmica no continente americano (JOHNSON, 1987), onde causa perdas importantes em diversas culturas, tais como milho (*Zea mays* L.), algodão (*Gossipium* spp. L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e gramíneas em geral (SPARKS, 1986). Na cultura do milho, no Brasil, estas perdas podem chegar a 39% da produção (CRUZ et al., 1999). Essa espécie é considerada praga de grande importância econômica, não somente pelos danos provocados, mas especialmente pela dificuldade de seu controle (LEIDERMAN; SAUER, 1953; CRUZ; TURPIN, 1983).

A disponibilidade de milho transgênico resistente às lagartas auxiliou no manejo

dessa praga, o que foi possível pela expressão de proteínas inseticidas (toxinas) derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (*Bt*) nas plantas. As toxinas de *Bt* podem ser expressas constitutivamente em concentrações relativamente constantes ou podem ser restritas a estádios da planta, tecidos, ou ambos (CERDA; PAOLETTI, 2004). No entanto, eventos transgênicos de milho atualmente disponíveis no mercado brasileiro expressam a toxina de forma constitutiva. O milho é a cultura *Bt* mais cultivada no Brasil, atingindo 82,7% do milho total cultivado em 2015, o que corresponde a 12,5 milhões de hectares (CÉLERES, 2015). A sua introdução no mercado brasileiro se deu com híbridos que expressam a proteína Cry1Ab (eventos MON810 e Bt11) em 2008. Em 2009, a proteína Cry1F (evento TC1507) foi liberada para comercialização em híbridos de milho no mercado brasileiro. Essa proteína foi um

<sup>1</sup>Eng.-Agrôn., Dr. em Entomologia Esalq/USP, Piracicaba, SP, alvesnat@gmail.com

<sup>2</sup>Eng.-Agrôn., Dr. em Entomologia, Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, Caixa Postal 151, Sete Lagoas, MG, simone.mendes@embrapa.br

<sup>3</sup>Eng.-Agrôn., Dr. em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, eliseu.pereira@ufv.br

sucesso na época, em razão da sua maior eficiência de controle que a proteína Cry1Ab para *S. frugiperda* (WAQUIL et al., 2002). No entanto, em 2012, as falhas no controle de *S. frugiperda* nos campos de milho Cry1F começaram a serem observadas (FARIAS et al., 2014).

As falhas de controle são causadas pela evolução da resistência em populações de pragas-alvo às proteínas expressas nas plantas *Bt* e são uma grande ameaça ao uso sustentável dessa tecnologia (FERRÉ; VAN RIE, 2002; MANYANGARIRWA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008b). O alto risco ocorre por causa da expressão contínua de proteína inseticida nas plantas, o que causa uma elevada pressão de seleção sobre as populações de insetos, favorecendo o desenvolvimento de biótipos resistentes das espécies-alvo (FERRÉ; VAN RIE, 2002; PEREIRA et al., 2008a). A evolução da resistência a uma lavoura *Bt* pode levar a uma diminuição da susceptibilidade de uma população de um inseto-alvo a ela (TABASHNIK et al., 2009), e consequente redução na eficácia de controle. Os insetos-praga são muito bem sucedidos na adaptação a inseticidas e outras táticas de controle (PALUMBI, 2001; ONSTAD, 2008). No caso de *S. frugiperda*, há vários relatos de resistência a inseticidas utilizados no seu controle no Brasil e nos EUA (McCORD; YU, 1987; YU, 1991; OMOTO; DIEZ-RODRÍGUEZ, 2001). Além disso, casos de resistência ao milho transgênico expressando a proteína Cry1F foram documentados em Porto Rico (STORER et al., 2010) e no Brasil (FARIAS et al., 2014; LEITE et al., 2016).

Assim como no caso de inseticidas sintéticos, para retardar a evolução da resistência em insetos praga às culturas *Bt*, é necessário o desenvolvimento de estratégias de manejo apropriadas. O manejo da resistência de insetos refere-se a um conjunto de procedimentos proativos aplicados em áreas agrícolas com a finalidade de prevenir,

retardar, detectar e mitigar a evolução da resistência das pragas aos agentes empregados no seu controle (ROUSH, 1997; ONSTAD, 2008; MACHADO; FIUZA, 2011). Uma etapa importante para determinação de condições que favorecem ou não o manejo da resistência de insetos a plantas *Bt* é a obtenção de populações em laboratório apresentando elevados níveis de resistência a estas toxinas (PEREIRA et al., 2008a, 2008b; LEITE et al., 2016; SANTOS-AMAYA et al., 2015).

Populações resistentes às proteínas do *Bt* são importantes para estudos de análise de risco de resistência de insetos e na elaboração, teste, desenvolvimento e aprimoramento de estratégias de manejo da resistência de insetos às plantas transgênicas. Na maioria dos relatos de resistência a *Bt* (FERRÉ; VAN RIE, 2002; LEITE et al., 2016), os experimentos de seleção têm sido realizados usando-se uma variedade de produtos de *Bt*, entre eles misturas formuladas de cristais e esporos, células encapsuladas de *Pseudomonas fluorescens* expressando proteínas Cry, protoxinas Cry, toxinas Cry e materiais derivados de plantas transgênicas expressando proteínas *Bt* (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Respostas variadas à seleção têm sido obtidas em experimentos conduzidos com populações de Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (MACGAUGHEY, 1985; TABASHNIK et al., 1990, 2000; WHALON et al., 1993; GOULD et al., 1995; WIRTH et al., 1997; CHAUFAUX et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2004; PEREIRA et al., 2008a).

A disponibilidade de populações da praga resistentes permite o estudo da herança e do custo da resistência, determinação das bases bioquímicas e fisiológicas, a obtenção de estimativas de frequência de alelos de resistência em populações de campo e, potencialmente, o desenvolvimento de ferramentas moleculares para monitorar a evolução da resistência no campo. A

implementação de estratégias de manejo da resistência de pragas a pesticidas, o que se aplica também a plantas *Bt*, depende do conhecimento de fatores genéticos, biológicos e operacionais que influenciam no processo da evolução da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). A determinação da herança da resistência e do custo adaptativo dos indivíduos resistentes em relação aos susceptíveis são importantes componentes para a elaboração e refinamento de programas de manejo da resistência (TABASHNIK, 1991; MCKENZIE, 2000). De acordo com Roush e Daly (1990), para um completo estudo da resistência é necessário avaliar o número de genes envolvidos, as relações de dominância e as bases genéticas da resistência cruzada entre os diversos inseticidas, nesse caso, toxinas de *Bt*.

Desse modo, a disponibilidade e a caracterização de linhagens de genótipos reconhecidamente suscetíveis e resistentes em laboratório fornecem informações essenciais para o desenvolvimento e aprimoramento de um plano racional de manejo de resistência (GOULD, 1998). Além disso, populações resistentes podem ainda ser úteis como ferramenta para validação experimental de táticas de manejo de resistência propostas (LIU; TABASHNIK, 1997; PEREZ et al., 1997; SHELTON et al., 2000; TANG et al., 2001). Nem sempre é possível a seleção de populações resistentes utilizando as proteínas inseticidas, pois essas devem ser fornecidas pelas empresas detentoras da tecnologia ou produzidas em laboratório. Uma alternativa seria utilizar a própria planta *Bt*, disponível no mercado, para selecionar populações de pragas resistentes e assim efetuar estudos para a caracterização da resistência da praga. Portanto, o objetivo desse trabalho foi propor e validar uma metodologia de seleção de populações resistentes de *S. frugiperda* ao milho Cry1F, a qual se aplica a qualquer tipo de milho *Bt*.

## Material e Métodos

### Origem e Manutenção de *S. frugiperda* em Laboratório

Os insetos selecionados para resistência a Cry1F foram coletados em dois municípios de Minas Gerais: Matozinhos (mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte; 19°33'50"S, 44°3'39"W) e Iraí de Minas (mesorregião do Triângulo Mineiro; 18°59'5"S, 47°27'51"W). Lavouras de milho transgênico Cry1F foram localizadas por técnicos da Embrapa Milho e Sorgo em novembro de 2010 e as plantas com sintomas de ataque de *S. frugiperda* foram examinadas para coleta dos indivíduos eventualmente presentes. Foram coletadas 121 lagartas em Matozinhos e 96 lagartas em Iraí, as quais foram acondicionadas individualmente em recipientes de 50 mL. Os recipientes foram identificados, colocados em caixa de isopor e levados ao laboratório. Posteriormente, uma triagem foi realizada para seleção dos indivíduos sadios, os quais deram origem a duas populações [Iraí (Ir) e Matozinhos (Ma)] que foram mantidas no laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos da Embrapa – Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

Os insetos foram mantidos com dieta artificial adaptada de Greene et al. (1976) sem exposição a nenhum inseticida, por cinco gerações até o início do experimento de seleção. Lagartas (< 24h de idade) foram transferidas ao acaso para 24 recipientes plásticos de 50 mL contendo em média 7 g de dieta artificial (Figura 1a). Os recipientes foram vedados com tampas de acrílico e após sete dias as lagartas foram transferidas para recipientes com dieta nova, colocando-se duas lagartas por recipiente num total de 168 recipientes e assim foram mantidas até a fase de pupa. Os adultos, cerca de 100 a 150 indivíduos, foram transferidos para uma gaiola de PVC de 40 cm h x 30 cm Ø, recoberta internamente com folhas de

papel sulfite para oviposição (Figura 1b). Estes foram alimentados com uma solução à base de açúcar (10%) e ácido ascórbico (5%). Do mesmo modo que as lagartas, os adultos foram acondicionados em ambiente controlado com temperatura de  $26 \pm 3^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 15\%$  e fotofase de 12 horas. As massas de ovos foram coletadas, após cinco dias da montagem das gaiolas, e armazenadas em saco plástico (10 L), no mesmo ambiente controlado, até eclosão das lagartas.



**Figura 1.** Materiais utilizados para criação de *Spodoptera frugiperda*. A) Recipientes plásticos de 50 mL com dieta artificial para criação de lagartas. B) Gaiola de oviposição de adultos.

## Seleção para a Resistência a Cry1F

O processo de seleção foi realizado de abril a outubro de 2011 utilizando-se folhas de milho *Bt* do evento TC1507 (híbrido 30F35H da Pioneer), que expressa a forma ativa da toxina Cry1F. O milho foi semeado, semanalmente, no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo. Os tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para o cultivo do milho (CRUZ, 2010), sem aplicação de inseticidas, fungicidas e herbicidas, sendo o controle de plantas daninhas realizado por capina manual.

Para se obter a população base para seleção com maior variabilidade genética, foi efetuado cruzamento dos insetos de Iraí e Matozinhos. Um total de 144 adultos, 80 fêmeas e 64 machos de cada população foi acondicionado

numa gaiola de PVC descrita anteriormente. A progênie deste cruzamento foi dividida em três subpopulações ou linhagens:

**IrmaC (controle):** foi mantida na ausência de pressão de seleção, sendo alimentada apenas com dieta artificial como descrito anteriormente.

**IrmaF:** foi submetida à pressão de seleção através de alimentação com folhas de milho Cry1F, estágio V4-V9, durante toda a fase larval, a cada geração.

**IrmaD:** foi selecionada através de alimentação com folhas de milho Cry1F, estágio V4-V9, por tempos crescentes de exposição durante o desenvolvimento larval, a cada geração (Tabela 1).

Assim, duas metodologias de seleção foram testadas: 1) larvas se alimentando em tempo integral de milho Cry1F e 2) larvas se alimentando gradualmente de milho Cry1F. Esses dois regimes de seleção foram utilizados para representar condições de alta e baixa pressão de seleção respectivamente, esperando-se obter respostas distintas como prevê a teoria (ROUSH; MACKENZIE, 1987). Os insetos foram mantidos em ambiente controlado conforme descrito anteriormente.

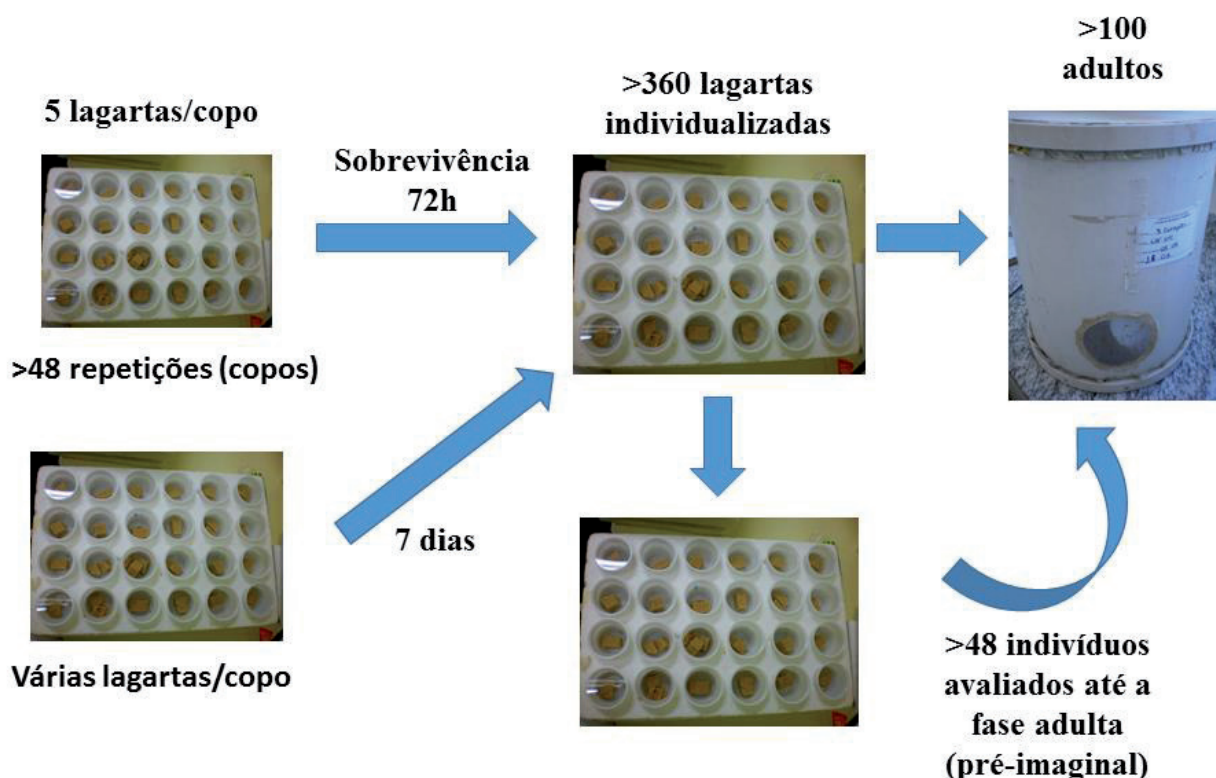
O experimento de seleção para resistência a Cry1F foi iniciado na primeira geração após o cruzamento dos indivíduos de Matozinhos e Iraí, sendo conduzidos com as três linhagens como descrito a seguir. A linhagem IrmaC foi usada como controle para obtenção de estimativas de mortalidade natural durante todo o experimento. Foram transferidas cinco lagartas neonatas (< de 24h de vida) por recipiente plástico de 50 mL contendo sete gramas de dieta artificial totalizando 240 lagartas. Após 72 h, foi anotado o número de lagartas sobreviventes e estas foram individualizadas, para evitar o canibalismo, em recipientes (50 mL) contendo a mesma



dieta. Outra parte das lagartas eclodidas (aproximadamente 1000 indivíduos) foi transferida para recipientes (50 mL) e após 72 h sem terem sido avaliadas foram individualizadas a fim de manter um alto número de indivíduos (Figura 2; Tabela 1).

50 mL contendo dieta artificial sem a toxina até a fase de pupa. Nas demais gerações do experimento, procedimento semelhante foi realizado nas primeiras 72 h e depois as lagartas foram individualizadas em recipientes contendo folhas de milho Cry1F, sendo que a

## IrmaC - Dieta

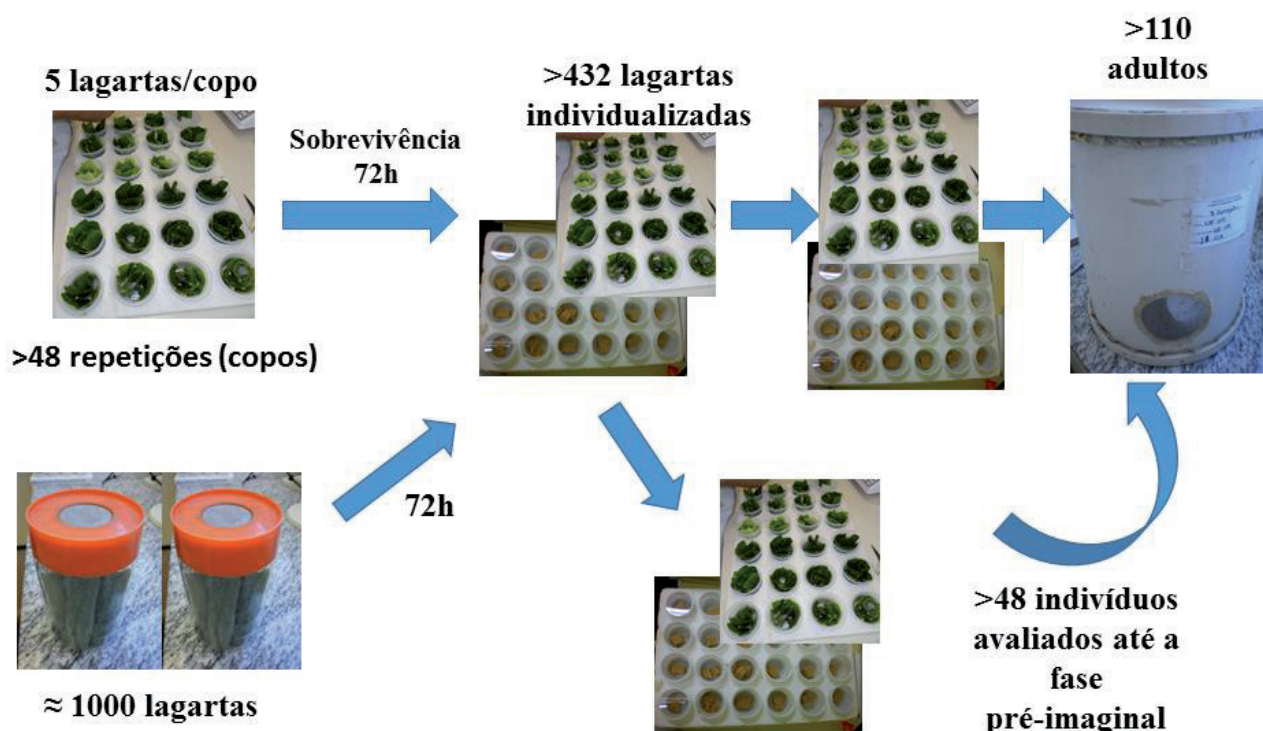


**Figura 2.** Etapas de manutenção e avaliação da linhagem IrmaC (controle) em dieta artificial.

Para a linhagem IrmaD, uma parte das lagartas neonatas (aproximadamente 1.000 indivíduos) foi acondicionada em dois potes cilíndricos (1,5 L), cada um contendo 70 g de folhas do milho Cry1F para se obter um número suficiente de sobreviventes e dar prosseguimento ao experimento. Outra parte foi transferida para recipientes de 50 mL, contendo folhas do milho Cry1F (preenchendo o volume do recipiente, em forma de cartucho), na quantidade de cinco lagartas por recipiente. Estas totalizando 240 indivíduos que foram avaliados para estimar mortalidade. Na primeira geração de seleção e após 72 horas de exposição a Cry1F os sobreviventes foram individualizados em recipientes de

cada geração o tempo de exposição às folhas de milho Cry1F foi aumentado gradualmente (Tabela 1). Após o período de exposição a Cry1F, os sobreviventes foram transferidos para recipientes contendo dieta artificial, exceto na quinta geração quando estiveram expostos à toxina por todo período larval. As folhas de milho foram substituídas a cada dois dias e o número de lagartas individualizadas variou a cada geração dependendo da sobrevivência, mas nunca sendo inferior a 480 (Figura 3; Tabela 1).

## IrmaD – exposição gradual



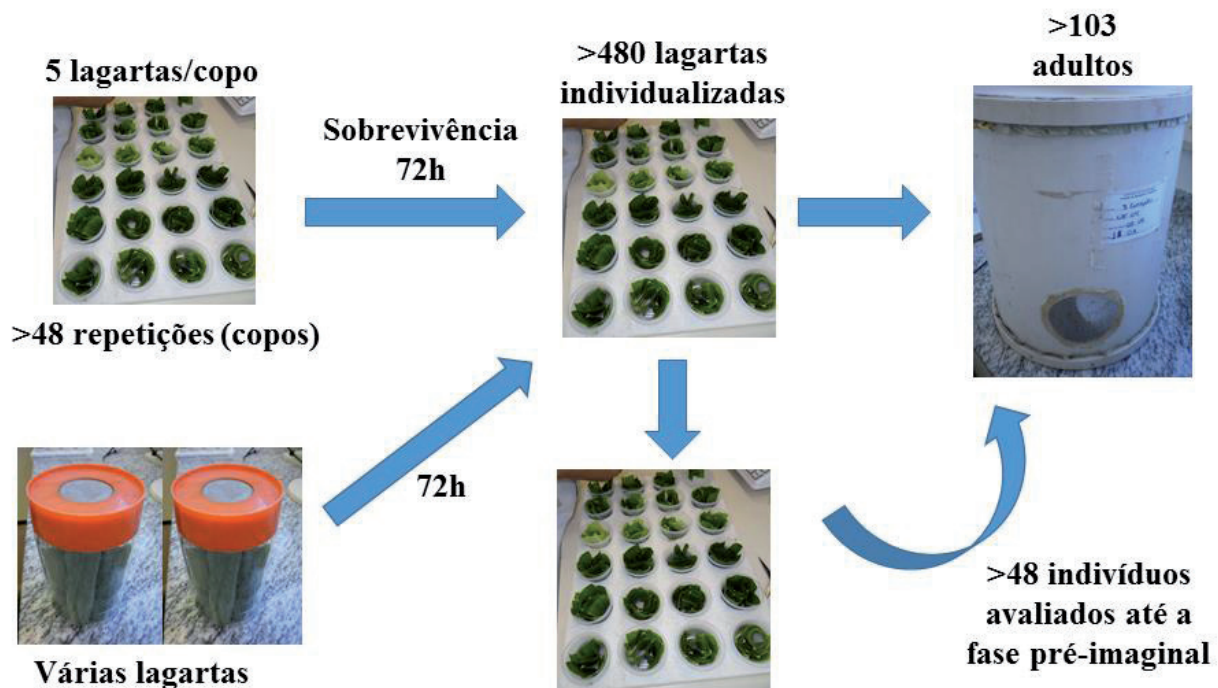
**Figura 3.** Etapas de manutenção e avaliação da linhagem IrmaD em folhas de milho Cry1F e dieta artificial.

O procedimento de seleção da linhagem IrmaF foi semelhante ao anterior, exceto que foi realizada exposição crônica dos indivíduos ao milho Cry1F durante toda fase larval (Figura 3; Tabela 1).

Para as três linhagens, e em cada geração do experimento, foi avaliada a sobrevivência larval às 72 h com base numa amostra de 240 indivíduos, dos quais no mínimo 48 foram avaliados para estimativa da sobrevivência até adulto.

Os adultos das três linhagens foram mantidos conforme descrito anteriormente, sendo contabilizado o número de adultos liberados por gaiola em cada geração de seleção. Daqueles avaliados que chegaram à fase adulta obteve-se a razão sexual (RS = número de fêmeas/número de machos + fêmeas) (Tabela 1). O procedimento de coleta das posturas também foi o mesmo descrito anteriormente.

## IrmaF – exposição crônica a Cry1F



**Figura 4.** Etapas de manutenção e avaliação da linhagem IrmaF em folhas de milho Cry1F.

**Tabela 1.** Histórico da seleção realizada nas linhagens IrmaF e IrmaD e manutenção da linhagem IrmaC, de *S. frugiperda* durante cinco gerações.

Geração	Tempo em Cry1F (dias)			Nº adultos (por gaiola)			Nº lagartas individualizadas			Nº indivíduos adultos (amostra)			Razão Sexual <sup>4</sup>		
	F*	D*	C*	F	D	C	F	D	C	F	D	C	F	D	C
1 <sup>a</sup>	t <sup>1</sup>	3	0	-	144 <sup>2</sup>	-	720	480	360	34	66	46	0,32	0,47	0,41
2 <sup>a</sup>	t	6	0	103	110	103	600	480	360	71	71	61	0,45	0,56	0,48
3 <sup>a</sup>	t	8	0	130 <sup>3</sup>	160	160	600	432	360	49	41	68	0,39	0,46	0,51
4 <sup>a</sup>	t	10	0	156	122	140	480	600	432	72	48	66	0,44	0,44	0,47
5 <sup>a</sup>	t	t	0	144	144	168	720	480	600	79	46	73	0,42	0,57	0,59

\* F, D, e C representam as linhagens IrmaF, IrmaD e IrmaC, respectivamente.

<sup>1</sup>t = tempo total (indivíduos alimentados durante toda fase larval).

<sup>2</sup>Uma gaiola contendo 144 indivíduos adultos deu origem as três populações Irma.

<sup>3</sup>Duas gaiolas, cada qual com 130 indivíduos adultos.

<sup>4</sup>Razão Sexual (RS = número de fêmeas/número de machos + fêmeas).

Sobrevivência em Folhas de Milho Cry1F após Seleção. Para confirmar a seleção, na sexta geração (após seleção), as linhagens IrmaC, IrmaD e IrmaF foram avaliadas quanto ao desempenho no híbrido de milho P30F35H expressando Cry1F e o seu isogênico não Bt (P30F35) (Pioneer Sementes, Santa Cruz do Sul, RS). O procedimento se deu da mesma forma como descrito anteriormente para seleção da linhagem IrmaF. Ainda, as lagartas foram mantidas em recipientes contendo folhas de milho Cry1F e controle de acordo com o tratamento. As lagartas foram individualizadas em 48 recipientes para quantificação da sobrevivência até adulto (até a fase adulta), sendo consideradas 12 repetições de quatro indivíduos cada.

As plantas de milho de onde foram retiradas as folhas ofertadas aos insetos foram testadas para expressão qualitativa de Cry1F. Semanalmente, foram retiradas amostras de folhas dos cartuchos de 10 plantas. Essas amostras foram submetidas à imunodeteção da proteína de interesse usando tiras

ImmunoStrip STX 10301/0050 (Agdia Inc., Elkhart, IN, EUA) conforme instruções do fabricante. Todos os testes foram normais para ausência ou presença da proteína (Figura 5).

## Análises dos Dados

Antes de proceder a análises estatísticas, todos os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias (PROC MIXED seguido de PROC UNIVARIATE e PROC GPLOT) (SAS INSTITUTE, 2002).

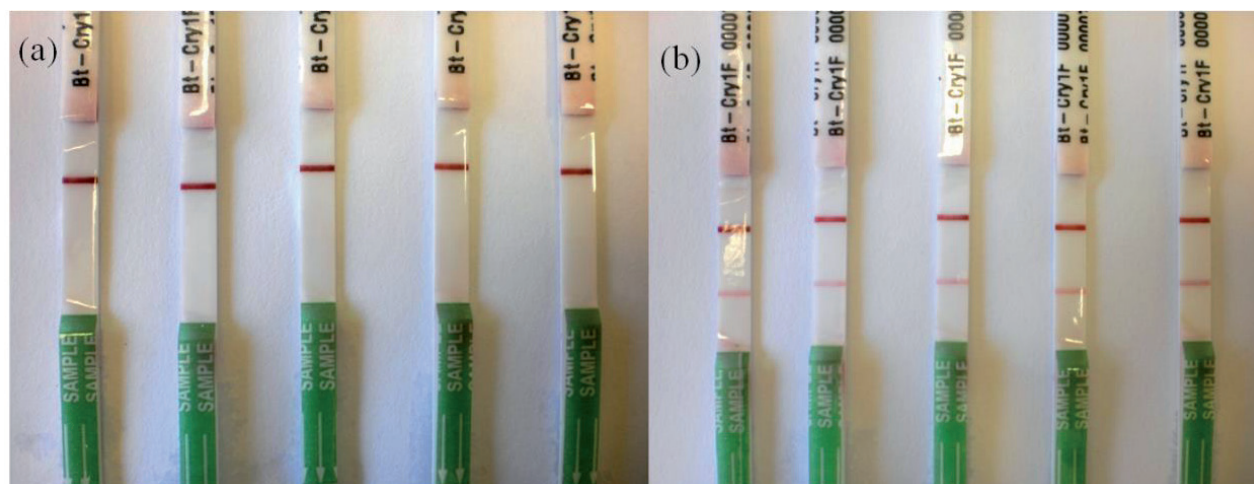
A média de sobrevivência e seu erro padrão foram plotados para cada geração de seleção. Para obter a resposta à seleção, a sobrevivência até adulto das linhagens parentais IrmaF e IrmaD foram submetidas à análise de regressão linear (PROC REG) (SAS INSTITUTE, 2002) pelo ajuste da sobrevivência das respectivas progênies.

Os resultados do ensaio de sobrevivência em folhas de milho Cry1F foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial



(3 linhagens de *S. frugiperda* x 2 híbridos milho) e, posteriormente, ao teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD ou teste t,  $P < 0,05$ ) (PROC GLM) (SAS INSTITUTE, 2002).

a sobrevivência da linhagem IrmaF foi semelhante à da IrmaC, o que demonstra o sucesso na seleção.



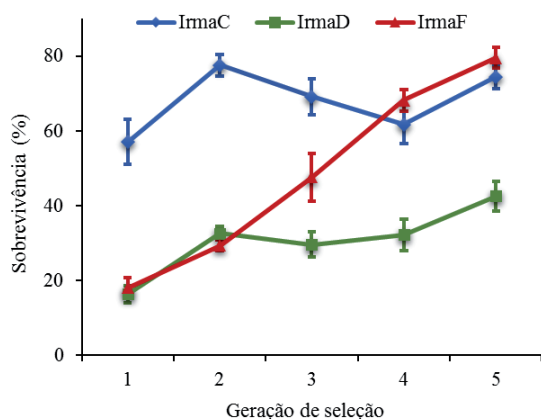
**Figura 5.** Fitas do teste de imunodeteção de Cry1F em folhas de plantas de milho. a) Tiras de cinco amostras de plantas do híbrido P30F35 (controle, i.e. não Cry1F) mostrando apenas as linhas controle. b) Tiras de amostras de cinco plantas do híbrido P30F35H mostrando as linhas controle (superiores) e as linhas indicadoras da presença de Cry1F (inferiores).

## Resultados

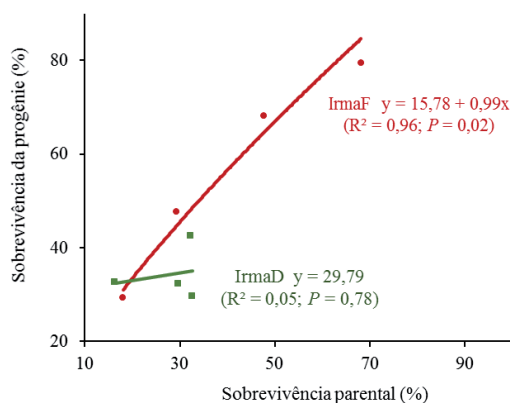
### Seleção para a Resistência a Cry1F

A sobrevivência média, a cada geração, das linhagens IrmaC (controle), IrmaD e IrmaF está representada na Figura 6. Como esperado, a sobrevivência da linhagem IrmaC em dieta, mantida na ausência de pressão de seleção durante o experimento, se manteve relativamente constante a cada geração. Na primeira geração e segunda gerações de seleção, a sobrevivência das linhagens IrmaF e IrmaD foi crescente e de modo semelhante (18% e 30%, respectivamente). Entretanto, a sobrevivência dessas linhagens foi significativamente menor que da linhagem IrmaC em dieta, demonstrando que houve resposta sob pressão de seleção. A partir da terceira geração a sobrevivência da linhagem IrmaF foi significativamente diferente da linhagem IrmaD, sendo que esta teve uma pequena elevação na sobrevivência apenas na quinta geração. Já na quarta geração,

Na Figura 7 observa-se a resposta à seleção das linhagens IrmaD e IrmaF, através da regressão da sobrevivência até adulto da progênie pela sobrevivência dos genitores. A linhagem IrmaF apresentou significativo ganho de sobrevivência à exposição à toxina Cry1F no decorrer do experimento, porém o mesmo não ocorreu para a linhagem IrmaD, a qual não apresentou significativo ganho em sobrevivência.



**Figura 6.** Sobrevivência até adulto (média  $\pm$  erro padrão) em cinco gerações de seleção para resistência à toxina Cry1F. A linhagem IrmaF foi mantida com exposição contínua à toxina, enquanto, na linhagem IrmaD, a exposição à toxina foi gradual. A linhagem IrmaC (controle) foi mantida em dieta artificial sem pressão de seleção.

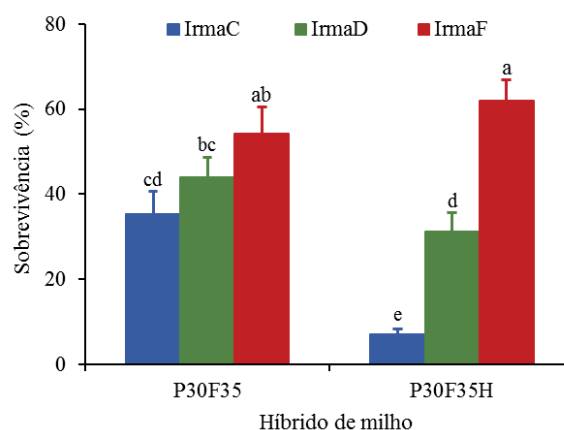


**Figura 7.** Resposta à seleção de *Spodoptera frugiperda* para resistência a Cry1F nas cinco gerações de seleção em laboratório. A linhagem IrmaF foi mantida com exposição contínua à toxina, enquanto, na linhagem IrmaD, a exposição à toxina foi aumentada gradativamente. O número de repetições foi de 12 para cada média calculada das duas linhagens.

### Sobrevivência em Folhas de Milho Cry1F após Seleção

Na sexta geração, a sobrevivência até adulto das linhagens IrmaC, IrmaD e IrmaF foi avaliada em milho Cry1F e seu isogênico não *Bt* (Figura 8). A análise de variância indicou que houve interação significativa entre as

linhagens de *S. frugiperda* e os genótipos de milho avaliados ( $F_{2,18} = 9,16$ ;  $P = 0,002$ ). A linhagem IrmaF teve suas médias de sobrevivência semelhantes nos dois genótipos de milho, demonstrando seu significativo nível de resistência a Cry1F. A linhagem IrmaD apresentou sobrevivência menor que da IrmaF no milho Cry1F, porém seu desempenho foi semelhante nos dois genótipos de milho. A linhagem IrmaC, no milho não *Bt*, apresentou sobrevivência semelhante a linhagem IrmaD. No milho Cry1F, IrmaC obteve a menor média de sobrevivência entre as linhagens, porém houve sobreviventes, o que indica a possível presença de alguns insetos resistentes nessa linhagem derivada do campo.



**Figura 8.** Sobrevivência até adulto das linhagens IrmaC, IrmaD e IrmaF de *Spodoptera frugiperda* em folhas dos híbridos de milho P30F35 (não *Bt*) e P30F35H (Cry1F) após as cinco gerações de seleção em laboratório para resistência a Cry1F. Médias ( $\pm$  erro padrão) com mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD protegido por ANOVA,  $P > 0,05$ , sob comparação dentro e entre genótipos de milho e linhagens de *S. frugiperda*.

### Discussão

Os resultados mostram que *S. frugiperda* respondeu à pressão de seleção com Cry1F em laboratório, resultando em significativos níveis de resistência à toxina em quatro gerações de seleção. O alto nível de

resistência desenvolvido foi evidente no teste de sobrevivência em folhas de milho Cry1F pós-seleção, onde as lagartas da linhagem IrmaF apresentaram maior taxa de sobrevivência em relação a IrmaD e IrmaC. Tabashnik et al. (1992) relataram que experimentos de seleção mais curtos (4-6 gerações) e iniciados com indivíduos de linhagens de diferentes locais, têm maiores chances na detecção de resistência que experimentos de seleção mais longos (> 10 gerações) com uma só linhagem. Esses autores ainda comentam que se nenhuma resposta à seleção ocorrer depois de 4-6 gerações, os alelos de resistência podem não estarem presentes na linhagem do laboratório. No presente estudo, a linhagem Irma foi proveniente do cruzamento de populações de dois locais diferentes, o que consequentemente aumentou sua variabilidade genética possibilitando um melhor desempenho na seleção. Em estudos prévios, outras duas espécies de *Spodoptera* foram selecionadas para resistência a toxinas *Bt* com tempos variáveis. *Spodoptera exigua*, após 21 gerações de seleção, exibiu apenas 8% de mortalidade na máxima concentração da toxina Cry1Ca testada (MOAR et al., 1995). *Spodoptera littoralis*, após 14 gerações de seleção, com uma mistura de esporo-cristal de uma linhagem de *Bt* expressando apenas Cry1Ca exibiu níveis de resistência maiores que 500 vezes (MÜLLER-COHN et al., 1996). A linhagem IrmaF do presente estudo, após as cinco gerações de seleção, sobreviveu igualmente na presença ou ausência da toxina.

O método de seleção da linhagem IrmaD por aumento gradual da exposição a Cry1F foi menos eficiente que o método de exposição crônica utilizado para seleção da linhagem IrmaF, demonstrado pela diferença na resposta da seleção entre as duas linhagens. As larvas de IrmaD foram selecionadas em folha de milho Cry1F e transferidas para dieta artificial, sendo que esse novo ambiente pode ter

causado mortalidade dos indivíduos tolerantes à toxina e permitido seleção natural que agiu freando a resposta à seleção artificial (FALCONER; MACKAY, 1996). Essa hipótese parece consistente com os dados da quinta geração de seleção, na qual a linhagem IrmaD foi alimentada em tempo integral com milho Cry1F e apresentou sobrevivência maior que nas demais gerações (Figura 6). Alternativamente, a diferença na resposta observada entre as linhagens IrmaD e IrmaF pode ser por causa da diferente pressão de seleção estabelecida pela duração de exposição à toxina. A curta exposição da IrmaD ao evento, principalmente nas primeiras gerações de seleção, pode ter viabilizado a perpetuação de insetos susceptíveis na linhagem, retardando o processo de seleção. Apesar de não significativa a regressão para o ganho em sobrevivência na linhagem IrmaD, sua maior sobrevivência no milho Cry1F em laboratório ao final do experimento de seleção indica que houve um ligeiro ganho de sobrevivência em relação à linhagem IrmaC. Desse modo, pode-se inferir que apesar de o método não ter sido eficiente como o utilizado para a linhagem IrmaF, a linhagem IrmaD também desenvolveu algum nível de resistência e precisa ser melhor avaliada, sobretudo quanto a estabilidade de sua manutenção em relação a IrmaF.

Pela resposta à seleção obtida em curto prazo, infere-se que o alelo de resistência a Cry1F estava presente nas populações de campo que deram origem às linhagens selecionadas. Para serem detectados em experimentos de seleção iniciados com 100-1.000 indivíduos, alelos de resistência devem estar em frequência de 0,005-0,0005 (TABASHNIK et al., 1990; GOULD et al., 1995). Possivelmente, os indivíduos coletados em plantas de milho Cry1F eram de fato mais tolerantes à toxina. Esse estudo reforça a necessidade da adoção de estratégias de manejo. Assim, em locais onde o milho *Bt* é cultivado continuamente, práticas de manejo de resistência precisam ser

adotadas de forma adequada, caso contrário é alto o risco de desenvolvimento de resistência.

Por causa da rápida seleção realizada nesse trabalho pode-se dizer que o alelo para resistência a Cry1F estava presente em pelo menos uma das populações de campo utilizadas no cruzamento, e que a intensidade de seleção pode ser considerada similar àquela observada em campo, uma vez que a seleção em laboratório foi feita usando o evento TC1507. Contudo, uma importante distinção entre condições de seleção em laboratório e em campo, que proporciona um efeito significativo na velocidade de evolução de resistência em populações de insetos, é o fato de que, em condições de laboratório, os indivíduos serem selecionados e mantidos em isolamento para cruzamentos subsequentes, sem a introdução de indivíduos susceptíveis, os quais na natureza podem ser proporcionados pela presença de refúgio (natural ou estruturado) ou por migração. Os resultados obtidos com a seleção gradual indicam que insetos susceptíveis podem ter escapado e sobrevivido à exposição. Isso pode ser uma indicação adicional de que a presença de indivíduos susceptíveis pode reduzir a velocidade com que a resistência evolui, enfatizando a importância da implementação do refúgio no manejo de resistência dessa espécie. A identificação de uma linhagem resistente oferece oportunidade para a obtenção de informações que permitam a validação de pressupostos atualmente utilizados para estabelecer recomendações do manejo de resistência (GOULD, 1998).

O método de seleção utilizado também foi inovador e revelou que a exposição crônica a tecidos de milho Cry1F foi mais eficiente que a exposição gradual, sendo que com apenas quatro gerações foi obtido sucesso na seleção da linhagem IrmaF com níveis significativos de resistência. Os resultados desse trabalho têm importantes implicações práticas, pois mostram que quando há sobreviventes de

insetos em plantas no campo, a seleção pode ser realizada em laboratório com certa agilidade utilizando-se apenas folhas de plantas Bt.

Os resultados obtidos com a seleção gradual indicam que quando insetos susceptíveis são mantidos na população a velocidade de evolução da resistência pode ser reduzida, exemplificando a importância de se plantar o refúgio, como forma de evitar a exposição intensa à proteína do Bt, evidenciando a prática de manejo de resistência. A disponibilidade de linhagens selecionadas oferece oportunidade para estudos de resistência cruzada a outras toxinas, o que ajudará na escolha destas para a piramidação em plantas de milho e/ou para rotação de híbridos de milho expressando diferentes toxinas. Além disso, permite a caracterização genética, bioquímica e molecular da resistência, o que poderá auxiliar no refinamento de recomendações para o manejo da resistência de pragas para as plantas Bt.

## Referências

- CÉLERES. **Informativo biotecnologia**. Uberlândia, 2015. Disponível em: <[http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501\\_150611.pdf](http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501_150611.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2016.
- CERDA, H.; PAOLETTI, M. G. Genetic engineering with *Bacillus thuringiensis* and conventional approaches for insect resistance in crops. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 23, n. 4, p. 317-323, 2004.
- CHAUFAUX, J.; SEGUIN, M.; SWANSON, J. J.; BOURGUET, D.; SIEGFRIED, B. D. Chronic exposure of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 94, p. 1564-1570, 2001.
- CRUZ, I.; TURPIN, F.T. Yield impact of larval infestations of the fall armyworm



(Lepidoptera: Noctuidae) to midwhorl growth stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 76, p. 1052-1054, 1983. CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. C. L.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v. 45, p. 293-296, 1999.

CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1).

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C. dos; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Surrey, v. 64, p. 150-158, 2014.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 47, p. 501-533, 2002.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 70, p. 319-323, 1977.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 43, p. 701-726, 1998.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNALDS, A.; BUMGARNER, L.; MOAR, W. Selection and genetic analyses of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high

levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 88, p. 1545-1559, 1995.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar (Lepidoptera, Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 69, p. 487-488, 1976.

JOHNSON, S. J. Migration and life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in Western Hemisphere. **Insect Science and its Application**, Elmsford, v. 8, p. 543-549, 1987.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milharais *Laphygma frugiperda* (Abbot e Smith, 1797). **O Biológico**, São Paulo, v. 19, p. 105-113, 1953.

LEITE, N. A.; MENDES, S. M.; SANTOS AMAYA, O. F.; SANTOS, C. A.; TEIXEIRA, T. P.; GUEDES, R. N.; PEREIRA, E. J. Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in a Brazilian strain of fall armyworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 158, p. 236-247, 2016.

LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E. Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2218-2223, 1997.

MACGAUGHEY, W. H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 229, p. 193-195, 1985.

MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Manejo da resistência: na era das plantas transgênicas. **Oecologia Australis**, v. 15, p. 291-302, 2011.

MANYANGARIRWA, W.; TURNBULL, M.; McCUTCHEON, G. S.; SMITH, J. P. Gene pyramiding as a *Bt* resistance management strategy: how sustainable is this strategy?

**African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, p. 781-785, 2006.

McCORD, E.; YU, S. J. The mechanisms of carbaryl resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 27, p. 114-122, 1987.

MCKENZIE, J. A. The character or variation: the genetic analyses of the insecticide-resistance phenotype. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 90, p. 3-7, 2000.

MOAR, W. J.; PUSZTAI-CAREY, M.; VANFAASSEN, H.; BOSCH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG, M. J. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 2086-2092, 1995.

MÜLLER-COHN, J.; CHAUFAUX, J.; BUISSON, C.; GILOIS, N.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Cry1C and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 89, p. 791-797, 1996.

OMOTO, C.; DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

ONSTAD, D. W. **Insect resistance management: biology, economics, and prediction**. San Diego: Elsevier, 2008.

PALUMBI, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. **Science**, Washington, v. 293, p. 1786-1790, 2001.

PEREIRA, E. J. G.; STORER, N. P.; SIEGFRIED, B. D. Inheritance of Cry1F resistance in

laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1F toxin. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 98, p. 621-629, 2008a.

PEREIRA, E. J. G.; LANG, B. A.; STORER, N. P.; SIEGFRIED, B. D. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 126, p. 115-121, 2008b.

PEREZ, C. J.; SHELTON, A. M.; ROUSH, R. T. Managing diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to foliar applications of *Bacillus thuringiensis*: testing strategies in field cages. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, p. 1462-1470, 1997.

ROUSH, R. T. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? **Pesticide Science**, Oxford, v. 51, p. 328-334, 1997.

ROUSH, R. T.; DALY, J. C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

ROUSH, R. T.; MACKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

SANTOS-AMAYA, O. F.; RODRIGUES, J. V.; SOUZA, T. C.; TAVARES, C. S.; CAMPOS, S. O.; GUEDES, R. N. C.; PEREIRA, E. J. G. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific Reports**, v. 5, n. 18243, p. 1-10, 2015.

SAS INSTITUTE. **SAS user's manual**: version 9.1. Cary, 2002.

SHELTON, A. M.; TANG, J. D.; ROUSH, R. T.; METZ, T. D.; EARLE, E. D. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 339-342, 2000.

SIQUEIRA, H. A. A.; MOELLENBECK, D.; SPENCER, T.; SIEGFRIED, B. D. Cross-resistance of Cyr1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 97, p. 1049-1057, 2004.

SPARKS, A. N. Fall armyworm (Lepidoptera, Noctuidae) - potential for areawide management. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 69, p. 603-614, 1986.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 103, p. 1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B. E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 84, p. 703-712, 1991.

TABASHNIK, B. E. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Diamondback Moth* (Lepidoptera: Plutellidae), Tobacco Budworm (Lepidoptera, Noctuidae), and Colorado Potato Beetle (Coleoptera, Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 1551-1559, 1992.

TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIERE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal**

**of Economic Entomology**, College Park, v. 102, p. 2011-2025, 2009.

TABASHNIK, B. E.; CUSHING, N. L.; FINSON, N.; JOHNSON, M. W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, p. 1671-1676, 1990.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; MAAGD, A.; DENNEHY, T. J. Cross-resistance of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4582-4584, 2000.

TABASHNIK, B. E.; SCHWARTZ, J. M.; FINSON, N.; JOHNSON, M. W. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 1046-1055, 1992.

TANG, J. D.; COLLINS, H. L.; METZ, T. D.; EARLE, E. D.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M. Greenhouse tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 94, p. 240-247, 2001.

WAQUIL, J. M.; VILLELA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt*) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, p. 1-11, 2002.

WHALON, M. E.; MILLER, D. L.; HOLLINGWORTH, R. M.; GRAFIUS, E. J.; MILLER, J. R. Selection of a colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 86, p. 226-233, 1993.

WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P.; FEDERICI, B. A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 20, p. 10536-10540, 1997.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p. 84-91, 1991.

#### Comunicado Técnico, 209

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
**Fone:** (31) 3027 1100  
**Fax:** (31) 3027 1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)  
**1ª edição**  
**Versão Eletrônica (2016)**

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



#### Comitê de publicações

**Presidente:** Sidney Netto Parentoni.  
**Secretário-Executivo:** Elena Charlotte Landau.  
**Membros:** Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Rosângela Lacerda de Castro.  
**Revisão de texto:** Antonio Claudio da Silva Barros.  
**Normalização bibliográfica:** Rosângela Lacerda de Castro.  
**Tratamento das ilustrações:** Tânia Mara A. Barbosa.  
**Editoração eletrônica:** Tânia Mara A. Barbosa.

#### Expediente